

İMMÜN REAKSİYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ VE TEKRARLANABİLİRLİĞİ

Yrd. Doç. Dr. Şükrü O.ÖZDAMAR (*), Dr. Levent YILDIZ (*), Yrd. Doç. Dr. Şaban SARIKAYA (**), Prof. Dr. Bedri KANDEMİR (*), Doç. Dr. Filiz KARAGÖZ (*), Prof. Dr. Sacit YILDIZ (**)

ÖZET: Başarılı sonuçlar alınmasının çok sayıda parametreye bağlı olması nedeniyle immünohistokimyasal tekniklerin uygulanmaları ve değerlendirilmelerinin standardizasyonu büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda bu konudaki çabalara katkı oluşturacağı düşüncesi ile dokulara uygulanan tekniklerin sonuçları iki farklı yöntem ile değerlendirilmiş ve bu yöntemlerin tek ve çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranları araştırılmıştır. 65 adet prostat adenokarsinomu dokusu parafin kesitlerinde B-SA peroksidaz yöntemi ile PSA ve PSAP varlığı araştırılmıştır. Sonuçlar sadece reaktif hücre fraksiyonunun belirlendiği 4 dereceli skorlama daha sonra ise 3 dereceli skorlama ve buna ek olarak boyanma yoğunluğunun da belirlenerek immünohistokimya bileşik skorunun saptandığı yöntemle değerlendirilmiştir. İlk değerlendirmeyi yapan uzman patoloğ ve bir diğer uzman patoloğ tarafından tekrarlanan değerlendirme sonuçları karşılaştırılmıştır. I. yöntemde genel immünreaksiyon tek gözlemci tekrarlanabilirlik oranı % 79.5, çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranı % 63.1 olarak saptanmıştır. II. yöntemde ise bu değerler sırasıyla; % 78.8 ve % 63.8 olarak belirlenmiştir. PSA için bu değerler % 81.6, % 67.2, % 68.6, % 64.7; PSAP için ise sırasıyla % 77.8, % 67.4, % 87.7 ve % 74 olarak belirlenmiştir. Her iki yöntem immünreaksiyon tek gözlemci tekrarlanabilirlik oranları çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranlarından daha yüksek bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELE: İmmün reaksiyon, standardizasyon, tekrarlanabilirlik.

SUMMARY: The techniques and evaluations of immunohistochemical assays are very important because successful results depends on numerous parameters. In this study we investigated intraobserver and interobserver reproducibility by two different methods in prostate adenocarcinomas. We looked for PSA and PSAP in 65 paraffin sections of prostate adenocarcinomas by B-SA peroxidase method. The results were evaluated first by 4 grade scoring system, and then by 3 grade scoring system. In addition, we took care of the intensity of immunohistochemical staining and determined combined immunohistochemical scoring. The samples were evaluated by a pathologist and then by another pathologist who did not know the results of the first. In the first method, the intraobserver reproducibility of immunohistochemical scoring was 79.5% in intraobserver evaluation. In the second method these were 78.8% and 63.8%, respectively. These results for PSA were 81.6%, 67.2%, 68.6% and 64.7% respectively. These results for PSAP were 77.8%, 67.4%, 87.7%, and 74% respectively. We found the ratio of intraobserver reproducibility higher than interobserver reproducibility in two methods ($p < 0.05$).

KEY WORDS: Immun reaction, standardization, reproducibility.

GİRİŞ

Özgün bir yöntem olarak 1941 yılında Coons tarafından tanımlanan ve 1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından hibridoma teknolojisi kullanılarak saf ve spesifik antikörlerin üretilmeye başlanması ile diagnostik patoloji pratiğinde yerini alan immünohistokimya, immünolojik prensip ve tekniklerin hücre ve doku ortamlarına uygulanması işlemidir. Son yıllarda geniş bir uygulama alanı bulan ve başarılı sonuçların alınmasının pek çok değişkene bağlı olduğu immünohistokimyasal tekniklerin uygulanma ve değerlendirilmelerinin standardizasyonu büyük önem taşımaktadır. Prostate specific acid phosphatase (PSAP) 1978'de; Prostate specific antigen (PSA) de 1981'de ilk kez immün peroksidaz yöntemi dokularda varlığı araştırılmaya başlanan belirleyicilerdir (3). Normal ve hiperplastik prostat gland epitellerinde uniform ve kuvvetli; neoplastik prostatik epitelde de grade, evre ve ploidy artışı ile ters orantılı olarak saptanırlar (3,6). Bu çalışmada prostat adenokarsinomu dokularında immünohistokimyasal teknikle PSA ve PSAP varlığı araştırılmış; sonuçlar kantitatif ve semikantitatif iki farklı yöntem ile yorumlanarak, bu yöntemlerin tek ve çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranları araştırılmıştır.

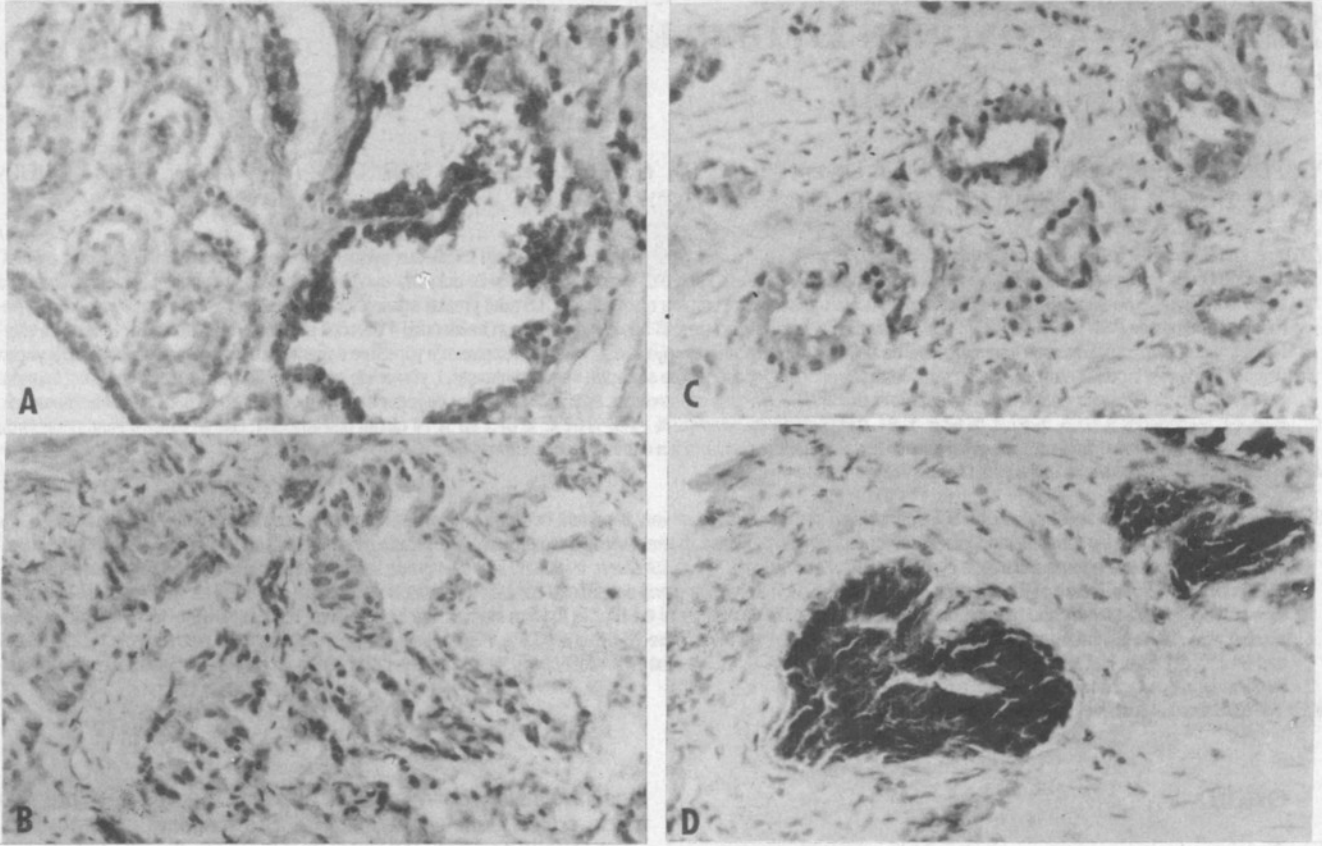
GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda 1989-1994 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda primer prostat adenokarsinomu tanısı almış çeşitli grade'lerden 65 lezyon incelendi. % 10'luk tamponlu nötral for-

malinde tespit edilmiş doku örnekleri parafin bloklarından elde edilen yeni seri kesitlerde Streptavidin-biotin peroksidaz tekniği ile PSA ve PSAP varlıkları araştırıldı. Teknik için Supersensitivite multilink immunodetection system, (Biogenex, USA) ve Prostate specific acid phosphatase (clone: PASE/4LJ, Biogenex, USA) ve Prostate specific acid phosphatase (clone: PASE/4LJ, Biogenex, USA) prediluted antikörleri kullanıldı. İmmünohistokimyasal çalışmaya 12 saat etüvde 56°C'da bekletilen ve daha sonra xylene (15'), absolu alkol (10'), 96° alkol (15') geçirilen kesitler distile su ile hidrasyon sonrası humidity chamber içerisinde % 34'lük hydrogen peroxide çözeltisinde 30 dakika inkübe edildi. Primer antikor (30'), biotinlenmiş antimouse immünooglobulin (20') ve horseradish peroxidase konjüge streptavidin (20') ile oda ısısında inkübe edilen kesitlere renklendirici olarak DAB (15') ve zıt boyama olarak da Mayer's hematoksilen (2') uygulandı. Preparatlar dehidrasyon ve şeffaflandırma işlemi sonrası Entellan (Merck, Germany) ile kapatıldı; daha sonra ışık mikroskobu ile incelendi. İlk olarak, heterojen, granüler DAB yoğunlaşmaları poziti reaksiyon kabul edilerek boyanma patterni tümör dokusunda herhangi bir lokalizasyonda odaksal ise fokal, yaygın ise diffüz boyanma olarak yorumlanan ve boyanmanın görüldüğü lokalizasyonda boyanma yoğunluğu; hücrelerin yaklaşık % 25'inde boyanma (+); hücrelerin yaklaşık % 50'sinde boyanma (++); hücrelerin yaklaşık % 75'inden fazlasında boyanma (+++) ve hücrelerin % 100'ünde (hemen hepsinde) boyanma (++++) kriterleri kullanılan kantitatif I. yöntemle (2,9) değerlendirildi. Daha sonra da; x400 büyütmede sayılan 100 hücrede, % 0-9 arasında boyanan hücre fraksiyonunu, 0; % 10-49 arasında boyanan hücre fraksiyonunu ise, 3 olarak derecelendiren ve boyanma yoğunluğunu (I) da dikkate alarak hafif = 0; orta = 1-2 (hafif+orta) ve yoğun = 3 olarak skorlayan; daha sonra ise, Bileşik immünohistokimya skoru (Boyanan hücre fraksiyonu x (I)): 3 = Bulunan değer tam sayıya tamamlanır

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Samsun

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Samsun



Resim. Vakalarımızda gözlediğimiz immünreaksiyon örnekleri (Biotin-Streptavidin Peroksidaz)

A: I. Yöntem:Fokal (+++);II. Yöntem: H:3 (PSAP,x400),
B: I. Yöntem:Diffüz (+++),II. Yöntem: H:2 (PSAP,x400),

C: I. Yöntem:Diffüz (+++);II. Yöntem: H:3 (PSA,x400),
D: I. Yöntem:Diffüz (+++); II. Yöntem: H:3 (PSA,x400).

TABLO 1 : GENEL DEĞERLENDİRME SONUÇLARINDA TEKRARLANABİLİRLİK İLİŞKİLERİ (PERASON CORRELATION MATRIX)

	I. Yöntem 1. Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem 1.Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem Diğer Gözl.	II. Yöntem Diğer Gözl.
I. Yöntem	1.000					
1. Yorum						
I. Yöntem	0.795	1.000				
2. Yorum						
II. Yöntem	0.790	0.773	1.000			
1. Yorum						
I. Yöntem	0.706	0.683	0.788	1.000		
2. Yorum						
II. Yöntem	0.677	0.631	0.712	0.631	1.000	
Diğer Gözl.						

= (H)'nın elde edildiği semikantitatif II. yöntemle (1,4,7) değerlendirildi. İlk yorumlamayı yapan uzman patoloğ tarafından bir süre sonra tekrarlanan değerlendirmeler ve bu değerlendirme sonuçlarından habersiz bir başka patoloğ tarafından yapılan yorumlama ile immünreaksiyon değerlendirilmesinin tekrarlanabilirliği araştırıldı. Elde edilen tüm veriler Systatw5 (Windows 3.1 uyumlu) istatistik programı kullanılarak bilgisayar ortamında değerlendirildi ve yorumlandı. Gruplararası ilişki Pearson correlation matrix ile sınılandı ve gruplararası farklar t testi ile araştırıldı. P<0.05 olan sonuç-

lar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

İmmünreaksiyon sonuçları incelendiğinde tüm boyanmalar neoplastik glandüler epitelyumda intrasitoplazmik lokalizasyonda heterojen karakterde gözleniyorken tümör stroması ve zemin elemanlarında reaksiyon mevcut değildi (resim). Pozitif kontrol amacıyla kullanılan normal prostat dokusu gland epitelyumlarında homogen ve kuvvetli PSA ve PSAP ekspresyonu gözlenmiş; negatif kontrol

kesitlerinde boyanma olmamıştır. Korelasyon analizi yardımı ile değerlendirilen ve yorumlanan sonuçlara bakıldığında I. yöntem genel immünreaksiyon tekrarlanabilirlik oranı % 79.5, çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranı % 63.1 iken II. yöntemde bu değerler sırası ile % 78.8 ve % 63.8 olarak belirlenmiştir. PSA için b değerler % 81.6, % 67.2, % 68.6, % 64.7; PSAP için ise sırasıyla % 77.8, % 67.4, % 87.7 ve % 74 olarak saptanmıştır (p<0.05) (Tablo 1-3).

**TABLO 2 : PSA SONUÇLARINDA TEKRARLANABİLİRLİK İLİŞKİLERİ
(PEARSON CORRELATION MATRIX)**

	I. Yöntem 1. Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem 1.Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem Diğer Gözl.	II. Yöntem Diğer Gözl.
I. Yöntem	1.000					
1. Yorum						
I. Yöntem	0.816	1.000				
2. Yorum						
II. Yöntem	0.840	0.832	1.000			
1. Yorum						
I. Yöntem	0.668	0.669	0.686	1.000		
2. Yorum						
II. Yöntem	0.672	0.607	0.676	0.684	1.000	
Diğer Gözl.						
II. Yöntem	0.544	0.547	0.647	0.582	0.850	1.000
Diğer Gözl.						

**TABLO 3 : PSAP SONUÇLARINDA TEKRARLANABİLİRLİK İLİŞKİLERİ
(PEARSON CORRELATION MATRIX)**

	I. Yöntem 1. Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem 1.Yorum	I. Yöntem 2. Yorum	II. Yöntem Diğer Gözl.	II. Yöntem Diğer Gözl.
I. Yöntem	1.000					
1. Yorum						
I. Yöntem	0.778	1.000				
2. Yorum						
II. Yöntem	0.759	0.727	1.000			
1. Yorum						
I. Yöntem	0.760	0.703	0.877	1.000		
2. Yorum						
II. Yöntem	0.674	0.641	0.673	0.603	1.000	
Diğer Gözl.						
II. Yöntem	0.5452	0.476	0.740	0.733	0.571	1.000
Diğer Gözl.						

TARTIŞMA

Saf ve spesifik antikorların üretilmeye başlaması ile birlikte geçen on yıl içerisinde cerrahi patolojide immünhistokimya daha çok kullanılmay başlanmıştır (4). Laboratuvarlar arasında histokimya prosedürler ile doku takibi farklılıkları, immünhistokimya tekniklerinin performansını olumsuz yönde etkilemektedir (4,5). Bunun sonucunda monoclonal ve polyclonal antikorların üretilme ve satışa sunulma aşaması, antikor performans kriterlerinin saptanması ve geliştirilmesi, kalite kontrol prosedürlerinin oluşturulması, immünperekسيدaz yöntemlerinin uygulanmasında standardın belirlenmesi, farklı fiksatiflerin doku antijenlerine olan etkileri ve dokularda oluşan antijen-antikor reaksiyonunun incelenmesi, özgüllüklerinin sınanması ve yorumlanmalarının tekrarlanabilirliğine yönelik olarak; standardizasyon üzerindeki çalışmalar 1979'da başlamıştır (4,5,7,8). İmmünhistokimya reaksiyonlarının derecelendirilmesinde önceleri kantitatif yöntemler kullanılmış, immün reaksiyon 3'lü veya 4'lü derecelendirme ile değerlendirilmiştir (2,9). Oldukça subjektif olan bu yöntemler yerlerini daha sonra genellikle boyanan hücre

fraksiyonları ile boyanma yoğunluğunu birleştiren semikantitatif yöntemlere bırakmaya başlamıştır (5,7). 1987-1989 arasında A.B.D.'de laboratuvarlararası immünreaksiyon değerleri tutarlılığı % 80 olarak saptanmıştır (11). Sonuçların yorumlanması arasındaki farklılıklar kantitatif ve semikantitatif tekniklerin seçimine bağlı olmayıp yalancı negatif değerlendirmeler ile % 80 ile % 100 arasındaki pozitiviteye verilen kararlardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (5). Elias, semikantitatif yöntemin düşük intra ve inter observer değişkenlik gösterdiği savunmakta (5); Aasmundstat da özellikle zayıf boyanmalarda boyanma yoğunluğu ile boyanan hücre oranının belirlenmesindeki güçlük üzerinde durmakta; semikantitatif yöntemin heterojenite ve sellülariteyi değerlendirmeye katan bir teknik olması nedeniyle tercih edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (1). Bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin araştırılması, bu yöntemlerin güvenli kullanımını sağlayacaktır (1,4,5,7). Günümüzde bazı merkezlerde görüntü analizörleri tarafından bilgisayar yardımı ile yapılarak bu reaksiyonların kantitasyonunun subjektif karakterinin ortadan kaldırılmasına çalışılmaktadır (7,10). Bosman'a göre immünhistokimya değerlendirme yöntemleri labo-

ratuvarlar arası ilişkide kullanılmalı, tanı amacı veya prognostik amaç gözetilmemelidir (4). Her tanısal amaç ile çalışan immünhistokimya laboratuvarı kalite kontrol ve standardizasyon programları çerçevesinde çalışmalıdır (4,5).

PSAP ilk kez 1925'de Demuth tarafından tanımlanmış 100 kd ağırlığında bir sialoproteindir. PSA ise 1979'da Wang tarafından tanımlanan ve moleküler ağırlığı 33 kd olan bir glikoproteindir (6). 1981'de ilk kez Papsidero ve ark. tarafından immünperekسيدaz yöntemle dokuda varlığı araştırılan PSA benign ve malign prostatik epitel dokularında gösterilmiştir (3). Normal ve hiperplastik prostatik epitelde PAP ve PSAP uniform ve kuvvetli reaksiyon verir. Buna karşın karsinom dokularındaki boyanma, benign prostat lezyonlarında görülenden zayıftır ve heterojendir; grade, stage ve ploidi artışı ile ters orantılı olarak gözlenir (3,6). Hammond ve Ebstein, kuvvetli PAP immünperekسيدasyonunun stage A2-D1 prostatik karsinomada sağkalım ile ilişkisini göstermişlerdir (3). Bu belirleyicilerin immünperekسيدaz yöntemlerle araştırılması, cerrahi patolojide metastatik prostat karsinomu ve prostat karsinomunun morfolojik varyantlarını ayırtmada, mesaneyi infiltre eden prostatik karsinomu se-

konder üretilen karsinomadan ve prostatı infiltre eden bir diğer karsinomu primer karsinomadan ayırdetmede özellikle yardımcı olmaktadır (3,6). Daha çok estrogen receptor değerlendirilmesi tekrarlanabilirliği (1) çalışmaları bulunan literatürde PSA ve PSAP değerlendirmelerinin tekrarlanabilirliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bu belirleyicilere karşı geliştirilen antikorların laboratuvarlararası immünohistokimyasal tanı değeri % 99 ile % 87 arasında saptanmaktadır; diğer bazı antikorlar ile karşılaştırıldığında bu değerler en üst sıralarda yer almaktadır (S-100 protein; % 96, keratin: % 79, GFAP: % 90, HBsAg: % 67, vs.) (11).

Çalışmamızda kantitatif ve semikantitatif yöntemler arasında tek gözlemci tekrarlanabilirlik oranları çok gözlemci tekrarlanabilirlik oranlarından düğü yüksek bulunmuştur. Bu, cerrahi patolojide immünohistokimya kullanımı gereği ile sık karşılaşmama ile birlikte değerlendirme yöntemlerine yatkınlık ve yöntemin subjektivitesi ile açıklanabilir. Ancak I. ve II. yöntem genel immünreaksiyon değerleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Semikantitatif yöntem; heterojenite ve sellülariteyi değerlendirmeye katan bir teknik olması nedeniyle, tercih edilebilir düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Aasmundstad TA, Haugen OA, Johannesen E, et al. Oestrogen Recep-

- tor Analysis: Correlation Between Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Methods. *J Clin Pathol* 45: 125-129, 1992.
2. Albores-Saavedra J, Nadj M, Morales AR, et al. CEA in Normal, Preneoplastic and neoplastic Gallbladder Epithelium. *Cancer* 52: 1069-1072, 1983.
3. Allsbrook WC, Simms WW. Histochemistry of the Prostate. *Hum Pathol* 23: 297-305, 1992.
4. Bosman FT, De Goeij AFPM, Rousch M. Quality Control in Immunocytochemistry: Experiences with the Oestrogen Receptor Assay. *J Clin Pathol* 45: 120-124, 1992.
5. Elias JM, Gown AM, Makamura RM, et al. Quality Control in Immunohistochemistry. Report of a Workshop Sponsored by the Biological Stain Commission. *Am J Clin Pathol* 92: 836-43, 1989.
6. Mostofi FH, Davis CJ, Sesterhenn IA. Pathology of Carcinoma of the Prostate. *Cancer Suppl* 70: 235-253, 1992.
7. Ravn V, Rasmussen BB, Højholt L, et al. Reproducibility of Subjective Immunohistochemical Estrogen and Progesterone Receptor Determination in Human Endometrium. *Path Res Pract* 1015-1022, 1993.
8. Rickert RR, Maliniak RM. Intralaboratory Quality Assurance of Immunohistochemical Procedures. Recommended Practices for Daily Application. *Arch Pathol Lab Med* 113: 673-679, 1989.
9. Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for The Surgical Pathologist, 2nd ed, Philadelphia, Saunders, 1994; 256-262.
10. Tubbs RR, Bauer TW. Automation of Immunohistology. *Arch Pathol Lab Med* 113: 653-657, 1989.
11. Wold LE, Corvin DJ, Rickert RR, et al. Interlaboratory Variability of Immunohistochemical Stains. Results of the Cell Markers Survey of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 113: 680-683, 1989.